

ÉTUDE DE LA CASÉINE κ DE VACHE
 CARACTÉRISATION DE LA LIAISON SENSIBLE À L'ACTION
 DE LA PRÉSURE

SUMMARY

Study of cow's κ -casein

Characterization of the rennin-sensitive linkage

κ -Casein has been reduced by LiBH_4 . A precipitate (P) and a supernatant (S) containing a substance soluble in 12% trichloroacetic acid and not dialysable are obtained: they seem to be very closely related respectively to para- κ -casein and κ -caseino-glycopeptide both obtained after rennin-digestion of κ -casein. Phenylalanine is the C-terminal amino acid of para- κ -casein and phenylalaninol has been detected in the precipitate (P). LiBH_4 reduces the rennin-sensitive linkage in κ -casein which seems to be an ester linkage involving the carboxyl group of the C-terminal phenylalanine residue of para- κ -casein.

INTRODUCTION

Lorsque l'on fait agir à pH 6.8 la présure ("rennin") sur la caséine κ de vache (0.05 unité d'enzyme cristallisé, soit 0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de solution protéique à 1%), il se forme, même en l'absence de calcium, un précipité (ou un gel), appelé paracaséine κ ; le liquide surnageant contient une substance qui est soluble dans l'acide trichloracétique et ne dialyse pas; il s'agit du caséino-glycopeptide κ ¹⁻³. Au cours de l'étude des extrémités C- et N-terminales des ces substances⁴ il a été possible de montrer que sérine, thréonine, alanine et valine font partie de la séquence C-terminale de la caséine κ ; ces mêmes acides aminés constituent l'enchaînement C-terminal du caséino-glycopeptide- κ , ce qui permet de supposer qu'il se trouve localisé dans la partie C-terminale de la caséine κ . Par contre, la paracaséine κ présente phénylalanine et leucine comme acides aminés C-terminaux. En utilisant la méthode de SANGER, aucun acide aminé N-terminal n'a pu être caractérisé jusqu'à présent pour la caséine κ ou pour les substances obtenues après action de la présure. Ce résultat semble suggérer que la liaison rompue par la présure n'est pas une liaison peptidique: le groupe carboxylique de phénylalanine ou (et) de leucine, acide aminé C-terminal de la paracaséine κ , n'apparaissant qu'après action de la présure sur la caséine κ , peut donc être lié à une fonction alcool du caséino-glycopeptide κ (sucre, hydroxyaminoacide). Cette hypothèse est en accord avec les travaux de GARNIER, MOCQUOT ET BRIGNON⁵, sur la valeur

du pK moyen des groupes titrés au cours de l'action de la présure sur la caséine κ . Ce pK est compris entre 4 et 5, valeurs qui ne correspondent pas à la dissociation d'un groupe α -aminé. Le travail exposé ci-après montre que la présure scinde dans la caséine κ une liaison de type ester impliquant le groupement carboxylique du résidu de phénylalanine C-terminal de la paracaséine κ .

MATÉRIEL ET MÉTHODES

La caséine κ a été préparée suivant la méthode de MCKENZIE ET WAKE⁶: elle se comporte de façon homogène au cours de l'ultracentrifugation et de l'électrophorèse. Son homogénéité a été discutée par WAKE AND BALDWIN⁷.

La réduction de la caséine κ par LiBH_4 a été effectuée de la façon suivante: 50 mg de caséine κ sont dissous dans 7 ml d'eau; le pH est amené à 8.2 avec NaOH 0.2 N. 125 mg de LiBH_4 sont ajoutés et le mélange réactionnel est agité pendant 2 h à 20°. L'excès d'hydrure double est ensuite détruit par addition de HCl et les substances ainsi obtenues sont dialysées à pH 5 contre de l'eau distillée à 2°.

La composition en acides aminées des différentes substances est déterminée après hydrolyse acide totale (HCl 6 N à 110°; pendant 18 h) grâce à un Autoanalyseur Technicon suivant la méthode de PIEZ ET MORRIS⁸.

La recherche des aminoalcools leucinol et phénylalaninol a été faite soit par ionophorèse sur papier Whatman No. 1 à pH 6.5 avec le solvant pyridine-eau-acide acétique (100:900:4, v/v), soit par chromatographie sur papier Schleicher et Schüll 507 dans le solvant⁹: pyridine-alcool isoamylique-eau (35:35:27, v/v).

RÉSULTATS

Au cours de la dialyse, après action de LiBH_4 sur la caséine κ , il se forme un précipité (P) que l'on peut séparer par centrifugation. Toujours, à l'intérieur du sac de dialyse, le surnageant contient une (ou plusieurs) substance(s) (S) ne dialysant pas et restant soluble(s) dans l'acide trichloracétique à 12%. Apparemment, presque tout s'est passé comme si l'on avait fait agir la présure sur la caséine κ . Le précipité (P) et le surnageant (S) ont donc été analysés et comparés respectivement à la paracaséine κ et au caséino-glycopeptide κ . Il est intéressant d'ajouter qu'au cours d'un essai témoin la caséine κ a été agitée à pH 8.2 pendant 2 h dans les conditions décrites ci-dessus, puis dialysée. En l'absence de LiBH_4 aucun précipité (P) ne s'est formé.

Etude du précipité (P)

Analyse: La composition en acides aminés du précipité (P) a été déterminée et comparée à celle de la paracaséine κ obtenue par action de la présure sur la caséine κ . Le Tableau I rend compte des résultats; les rapports moléculaires des acides aminés ont été exprimés en admettant pour la caséine κ un poids moléculaire de 26000 \pm 3000, comme le suggèrent MCKENZIE ET WAKE¹⁰, et pour le caséino-glycopeptide un poids moléculaire de 8000 \pm 1000 (voir réf. 3). Du Tableau I, se dégage une grande similitude de composition entre la paracaséine κ et le précipité (P), sauf en ce qui concerne phénylalanine, acide glutamique et histidine. Comme la phénylalanine est impliquée dans l'enchaînement C-terminal de la paracaséine κ (voir réf. 4), une recherche de la présence éventuelle de phénylalaninol a été entreprise: cet aminoalcool résulterait

ÉTUDE DE LA CASÉINE κ

alors de la réduction par LiBH_4 du groupement carboxylique de phénylalanine impliqué dans une liaison ester. La diminution du nombre de résidus d'acide glutamique pourrait résulter d'une transformation de cet acide aminé en acide α -amino- δ -hydroxyvalérianique par suite de la réduction du groupement carboxylique en γ . Quant à l'histidine, elle paraît être partiellement transformée au cours de la réduction.

TABLEAU I
COMPOSITION DE LA PARACASÉINE κ ET DU PRÉCIPITÉ (P) OBTENU APRÈS RÉDUCTION PAR LiBH_4 ,
EXPRIMÉE EN POURCENT (%) ET EN RAPPORT MOLÉCULAIRE (r)

Acide aminé	Paracaséine κ		Précipité (P)
	%	r	
Asp	6.95	13	13
Thr	3.15	7	7
Ser	5.10	13	13
Glu	17.75	28 \pm 1	24 \pm 1
Pro	8.70	17	17
Gly	1.15	4	4
Ala	5.45	13 \pm 1	13 \pm 1
Cys	1.10	1-2	1-2
Val	4.95	10	10
Met	(0.9)	1-2	Traces
Ileu	5.75	10 \pm 1	10 \pm 1
Leu	6.90	12 \pm 1	12 \pm 1
Tyr	10.5	13 \pm 1	13 \pm 1
Phe	5.0	6	5,2
Try	1.6	2	2
Lys	9.8	12	12
His	2.75	4	2
Arg	4.75	6 \pm 1	6 \pm 1

Détermination du phénylalaninol

Le phénylalaninol réagit beaucoup plus faiblement avec le réactif à la ninhydrine qu'un acide aminé comme la leucine: 4 μ moles de l'aminoolcool (Phénylalaninol purum, Fluka, Buchs (Suisse)) donnent, à 570 $m\mu$, la même coloration que 1 μ mole de leucine. Aussi, comme un seul résidu de phénylalanine doit en principe être transformé, une caractérisation sur papier a été préférée. Lorsqu'un hydrolysate acide total du précipité (P) est soumis à une ionophorèse sur papier à pH 6.5, on observe, après révélation à la ninhydrine une tache de $m = +1.2$. Cette mobilité est plus importante que celle des acides aminés basiques lysine et arginine: il s'agit donc d'une substance plus basique. Notons que le phénylalaninol, mais non pas le leucinol, a la même mobilité. Une quantité plus importante de ce produit est obtenue au cours de plusieurs ionophorèses préparatives suivies d'élutions. La substance chromatographiée dans le solvant pyridine-alcool isoamylique-eau a un R_F supérieur au R_F des acides aminés; par contre, son R_F est égal à celui du phénylalaninol qui, dans ce solvant, se sépare parfaitement du leucinol. Le Tableau II résume les différents résultats obtenus.

Par contre, on n'a pas pu mettre en évidence de leucinol: la paracaséine κ ne semble donc pas formée de deux chaînes peptidiques, mais d'une seule ayant leucine-phénylalanine comme séquence C-terminale.

LiBH_4 , par son action sur la caséine κ , donne donc naissance à une substance très

TABLEAU II

CARACTÉRISATION DU PHÉNYLALANINOL DANS DIFFÉRENTS SOLVANTS

Solvant A: *n*-butanol-acide formique-eau (75:15:10, v/v) papier Whatman No. 1. Solvant B: pyridine-alcool isoamylique-eau (35:35:27, v/v) papier Schleicher et Schüll No. 507. Ionophorèse: pyridine-eau-acide acétique (100:900:4, v/v) (pH 6.5), 2 h à 750 V, papier Whatman No. 1.

Acide aminé ou aminoalcool	Solvant A (<i>R_F</i>)	Solvant B (<i>R_F</i>)	Ionophorèse mobilité
Arg	0.08	0.03	+ 1
Phe	0.63	0.35	0
Leu	0.70	0.39	0
Leucinol	0.70	0.49	+ 1.3
Phénylalaninol	0.70	0.56	+ 1.2
Aminoalcool dans précipité (P)	0.70	0.56	+ 1.2

voisine de la paracaséine κ dont la phénylalanine terminale a son groupement carboxylique impliqué dans une liaison ester.

Etude de la substance (S)

A priori, on peut attribuer à la substance (S) une certaine ressemblance avec le caséino-glycopeptide κ par suite de sa solubilité dans l'acide trichloracétique à 12 % et de sa propriété de ne pas dialyser. La substance (S) est d'ailleurs purifiée par des dissolutions répétées dans l'acide trichloracétique à 12 %.

Comme le montre le Tableau III, la composition en acides aminés de la substance (S) ressemble à celle du caséino-glycopeptide³. Alors que la caséine κ de départ contient des quantités égales d'une part de thréonine et de sérine, et d'autre part de leucine et de isoleucine⁴, le caséino-glycopeptide obtenu après action de la présure présente des rapports moléculaires caractéristiques pour thréonine/sérine (5/3) et pour isoleucine/leucine (5/1). Dans la substance (S) ces rapports se rapprochent de ceux observés dans le caséino-glycopeptide. D'autre part, la substance (S) comme le caséino-glycopeptide κ obtenu après action de la présure ne contient ni acides aminés aromatiques, ni acides aminés soufrés, ni histidine, ni arginine.

TABLEAU III

COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS DU CASÉINO-GLYCOPEPTIDE κ ,
DU CASÉINO-GLYCOPEPTIDE κ RÉDUIT PAR LiBH_4 ET DE LA SUBSTANCE (S)

Résultats exprimés en rapports moléculaires.

Acide aminé	Caséino-glycopeptide	Caséino-glycopeptide réduit	Substance (S)
Asp	4	3-4	4
Thr	9	7	7
Ser	6	4-5	5
Glu	9	6	5
Pro	7	5	7
Gly	1	1	1
Ala	5	3	3
Val	5	3	3
Ileu	5	3	2-3
Leu	1	1	1
Lys	3	+	+

Les différences de composition constatées entre la substance (S) et le caséino-glycopeptide peuvent être attribuées au fait que LiBH_4 a, dans le cas présent, coupé d'autres liaisons qui ne sont pas touchées par la présure. En relation avec cette observation le caséino-glycopeptide obtenu après action de la présure a été à son tour soumis à une réduction par LiBH_4 . Le caséino-glycopeptide réduit est différent du caséino-glycopeptide initial, mais ressemble beaucoup à la substance (S).

La substance (S) contient beaucoup de sucres, comme cela a été vérifié par la dosage de SCHULTZE¹¹, alors que le précipité (P) en contient fort peu. Une répartition analogue des sucres a été constatée entre le caséino-glycopeptide et la paracaséine.

DISCUSSION

En agissant sur la caséine κ , LiBH_4 , comme la présure, donne naissance à deux sortes de substances: un précipité (P) en tout point comparable à la paracaséine κ et une substance (S) très voisine du caséino-glycopeptide et riche en sucres. LiBH_4 semble couper en outre, dans le caséino-glycopeptide, quelques liaisons que la présure laisse intactes, comme par exemple d'éventuelles liaisons ester entre un résidu de l'acide aspartique ou de l'acide glutamique et un sucre. Dans les conditions de température, de pH et de durée d'action décrites plus haut, le rendement du précipité (P) est de l'ordre de 30-40 %. De l'étude comparée du précipité (P) et de la paracaséine κ , on peut déduire que la liaison sensible à l'action de la présure est une liaison ester mettant en jeu le groupement carboxylique d'un résidu de phénylalanine et le groupement hydroxyle soit d'un sucre, soit d'une hydroxyaminoacide.

Comme le précipité (P) contient un peu moins d'acide glutamique que la paracaséine κ , on pourrait imaginer une liaison ester entre le groupement carboxylique en γ des résidus d'acide glutamique manquants et un sucre du caséino-glycopeptide. La recherche de l'acide α -amino- δ -hydroxyvalérianique éventuellement formé doit être entreprise, mais l'hypothèse de ces nouvelles liaisons ester n'est pas en accord avec les travaux de GARNIER *et al.*⁵ mentionnés dans l'introduction.

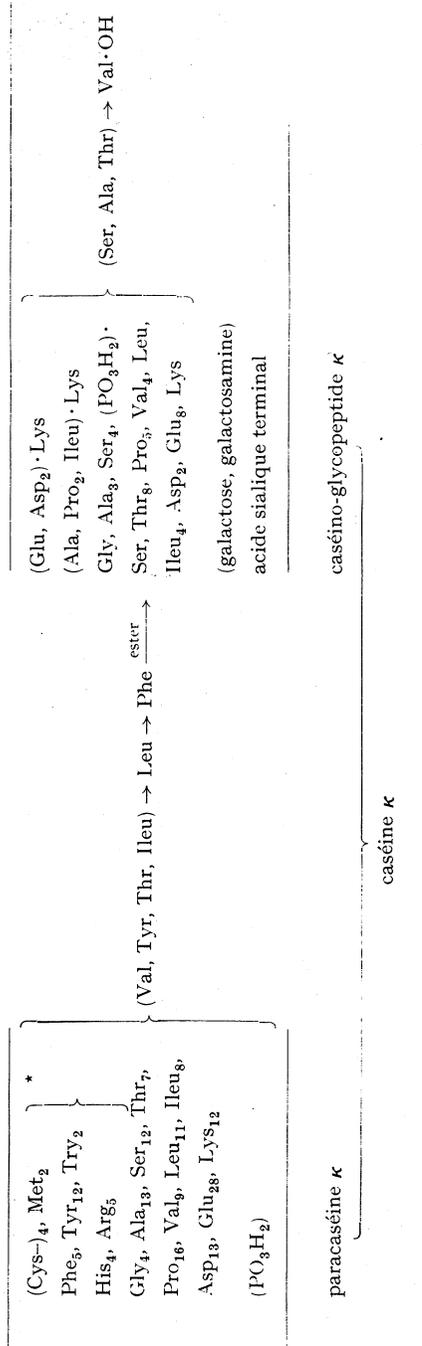
Les résultats que se dégagent du présent travail joints à ceux obtenus précédemment permettent de développer de façon provisoire la formule de la caséine κ comme indiqué dans le Tableau IV.

Le poids moléculaire admis pour la caséine κ est de 26000 ± 3000 , suivant MCKENZIE ET WAKE¹⁰ et pour le caséino-glycopeptide de 8000 ± 1000 (voir réf. 3). Ces chiffres sont en accord avec les résultats obtenus au cours de l'étude des acides aminés C-terminaux, car dans ces conditions, un résidu de valine seulement est libéré lorsque la carboxypeptidase agit pendant 2 h à 37° , sur la caséine κ comme sur le caséino-glycopeptide κ .

La paracaséine κ contient tous les acides aminés soufrés et aromatiques, toute l'histidine et toute l'arginine de la caséine κ ; les sucres ne sont présents qu'à l'état de traces. Par une liaison ester impliquant son résidu de phénylalanine C-terminal, la paracaséine κ est reliée au caséino-glycopeptide κ . Le caséino-glycopeptide κ est situé du côté C-terminal de la caséine κ , car il a la même séquence C-terminale que cette dernière⁴. Deux peptides obtenus par hydrolyse trypsique³ figurent, dans le Tableau IV. Le caséino-glycopeptide κ enfin contient presque tous les sucres de la caséine κ , l'acide *N*-acétylneuraminique occupant une place terminale¹².

TABLEAU IV

SCHÉMA DE STRUCTURE DE LA CASÉINE κ DE VACHE



* La totalité des acides aminés soufrés, aromatiques et basiques (sauf Lys) de la caséine κ se trouvent dans la paracaséine κ

ÉTUDE DE LA CASÉINE κ

REMERCIEMENTS

Nous exprimons notre gratitude à Monsieur le Professeur E. LEDERER, Directeur du Laboratoire de Chimie biologique, Paris et au Dr. G. MOCQUOT, Directeur de la Station Centrale de Microbiologie et Recherches Laitières, Jouy-en-Josas (S. et O.), pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail.

Nous remercions Mademoiselle A. BROCHET de sa précieuse collaboration technique.

Ce travail a bénéficié d'une subvention du Ministère de l'Agriculture des Etats-Unis (FG-Fr-112).

RÉSUMÉ

Au cours de la réduction de la caséine κ par LiBH_4 , se forment un précipité (P) et une substance (S) soluble dans l'acide trichloracétique à 12 % et non dialysable, qui sont très voisins respectivement de la paracaséine κ et du caséino-glycopeptide κ obtenus après action de la présure sur la caséine κ . Phénylalanine est l'acide aminé C-terminal de la paracaséine κ et il a été possible de caractériser le phénylalaninol dans le précipité (P). LiBH_4 scinde donc, dans la caséine κ , la liaison sensible à l'action de la présure qui est une liaison ester impliquant le groupement carboxylique du résidu de phénylalanine C-terminal de la paracaséine κ .

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ C. ALAIS, G. MOCQUOT, H. NITSCHMANN ET P. ZAHLER, *Helv. Chim. Acta*, 36 (1953) 1955.
- ² P. JOLLÈS ET C. ALAIS, *Compt. Rend.*, 251 (1960) 6205.
- ³ P. JOLLÈS, C. ALAIS ET J. JOLLÈS, *Biochim. Biophys. Acta*, 51 (1961) 309.
- ⁴ P. JOLLÈS, C. ALAIS ET J. JOLLÈS, *Arch. Biochem. Biophys.*, 98 (1962) 56.
- ⁵ J. GARNIER, G. MOCQUOT ET G. BRIGNON, *Compt. Rend.*, 254 (1962) 372.
- ⁶ H. A. MCKENZIE ET R. G. WAKE, *Biochim. Biophys. Acta*, 47 (1961) 240.
- ⁷ R. G. WAKE ET R. L. BALDWIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 47 (1961) 225.
- ⁸ K. A. PIEZ ET L. MORRIS, *Anal. Biochem.*, 1 (1960) 187.
- ⁹ L. PÉNASSE, M. JUTISZ, C. FROMAGEOT ET H. FRAENKEL-CONRAT, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 551.
- ¹⁰ H. A. MCKENZIE ET R. G. WAKE, *Australian J. Biol. Sci.*, 12 (1959) 734.
- ¹¹ H. E. SCHULTZE, R. SCHMIEDTBERGER ET R. HAUPT, *Biochem. Z.*, 329 (1958) 490.
- ¹² C. ALAIS ET P. JOLLÈS, *Biochim. Biophys. Acta*, 51 (1961) 315.

Biochim. Biophys. Acta, 69 (1963) 511-517